

Стадниченко А.В.¹, Краснопольский Ю.М.², Ярных Т.Г.¹

¹ Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина

² Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», Харьков, Украина

Stadnichenko A.¹, Krasnopol'sky Y.², Yarnykh T.¹

¹ National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

² National Technical University "Kharkiv Politechnical Institute", Kharkiv, Ukraine

Изучение факторов, влияющих на стабильность липосом с цитостатиками при регидратации

Research of factors affecting the stability of liposomes with cytostatics after rehydration

Резюме

Оксалиплатин и иринотекан являются перспективными веществами для создания липосомальной лекарственной формы. Разработка препаратов проводилась с конечной лиофилизацией для повышения показателей стабильности готовых лекарственных форм. Для успешного применения липосомальных препаратов в терапевтической практике необходимо обеспечить их необходимую стабильность после регидратации, перед введением. Стабильность включает сохранность инкапсуляции и размера в случае каждой липосомы, а также термодинамическую стабильность коллоидной системы в целом. Было изучено влияние холестерина на сохранность размера и степени инкапсуляции на примере липосом с иринотеканом. Липосомы были получены методом «химического градиента», с цитратом натрия в качестве внутреннего буферного раствора. Показано, что холестерин повышает стабильность размеров и инкапсуляции, оптимальным содержанием которого является 20% массовых. Также было изучено влияние дзета-потенциала на термодинамическую стабильность липосом после регидратации на примере липосом с иринотеканом и оксалиплатином. Повышения стабильности для липосом с иринотеканом удалось достигнуть при помощи добавки L-лизина в концентрациях 0,012%, при этом значение дзета-потенциала составило -5,1 mV.

Ключевые слова: оксалиплатин, иринотекан, липосомы, липидный бислой, экструзия при высоком давлении, дзета-потенциал.

Abstract

Oxaliplatin and irinotecan are prospective active pharmaceutical ingredients (API) for liposomal form creation. Development with the final lyophilization was carried out to improve stability of the eventual dosage forms. It is necessary to provide essential stability of colloidal formulations after rehydration, for the successful application of liposome preparations in therapeutic practice. The stability parameters involves such criteria, as encapsulation degree and liposomes size, as well as the thermodynamic stability of the whole colloidal system. The effect of cholesterol on the liposomes

size and the encapsulation degree after rehydration, with liposomal irinotecan as example, was studied. Liposomes were obtained by “chemical gradient”, with sodium citrate as the internal buffer solution. It was shown that cholesterol improves the stability of size and encapsulation degree, the optimum content was 20% by weight. The influence of the zeta potential on the thermodynamic stability of the liposomes after rehydration was also studied with liposomal irinotecan and liposomal oxaliplatin as examples. Increased stability of irinotecan liposomes was achieved with the addition of L-lysine (concentration 0.012%), the value of the zeta potential was -5,1 mV.

Keywords: oxaliplatin, irinotecan, liposomes, a lipid bilayer, extrusion under high pressure, dzeta potential.

■ ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные средства в виде эмульсий являются широко распространенными в современной фармацевтической практике [1, 2]. Одними из основных преимуществ эмульсий являются возможность создания водных форм гидрофобных препаратов, а также инкапсулирование лекарственных средств, преждевременный контакт которых с тканями и средами организма нежелателен [3, 4]. Примером таких эмульсий могут служить липосомы – сферические наночастицы, состоящие из липидного бислоя и внутренней водной фазы, способной эффективно инкапсулировать в себя водорастворимые лекарственные вещества [5, 6]. Зачастую целевыми молекулами для инкапсуляции являются вещества цитостатики, обладающие, наряду с лекарственным потенциалом, выраженным токсическим действием на организм. Наличие липидов для регенерации поврежденных мембран клеток, а также плавное высвобождение действующего вещества позволяют липосомальным фармацевтическим формам снизить токсичность цитостатиков, в сравнении с обычными растворами и концентратами для инфузий [7].

Как важнейшие показатели качества эмульсий можно отметить химическую стабильность инкапсулированного вещества, а также термодинамическую стабильность коллоидной системы [8, 9]. Структурная прочность липосом как составных частей эмульсии во многом зависит от липидного состава бислоя. Холестерин в составе липидной мембраны участвует в регуляции текучести мембраны, препятствует плотной упаковке углеводородных гидрофобных цепей, тем самым повышая степень упорядоченности, снижает скорость движения цепей в жидкокристаллическом состоянии, что в итоге приводит к повышению жесткости липидного бислоя [10].

Термодинамическая стабильность эмульсионной системы после регидратации влияет на сохранность инкапсуляции и размера липосом [11]. Сохранность коллоидного состояния без признаков коагуляции является в числе прочих показателем качества лекарственного средства.

Препараты цитостатики – иринотекан и оксалиплатин – являются перспективными терапевтическими средствами как при одиночном, так и при комбинированном применении [12]. Однако, помимо достоинств,

Наличие липидов для регенерации поврежденных мембран клеток, а также плавное высвобождение действующего вещества позволяют липосомальным фармацевтическим формам снизить токсичность цитостатиков, в сравнении с обычными растворами и концентратами для инфузий.

они обладают основным недостатком цитостатиков – высокой токсичностью, что делает их объектами исследований при создании липосомальных систем доставки.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

На примере липосом с иринотеканом изучить влияние содержания холестерина на стабильность размеров и инкапсуляции липосом после регидратации. Рассмотреть влияние дзета-потенциала при различных составах липосом с оксалиплатином и иринотеканом на стабильность липосомальных форм препаратов после регидратации. Определить факторы, влияющие на термодинамическую стабильность.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изготовления липосом использовали яичный фосфатидилхолин фирмы Lipoid, Германия. Холестерин, трегалозу, лактозу использовали производства фирмы Sigma-Aldrich, США. Липидную пленку получали на роторном испарителе Buchi 210 с вакуумным контролером при остаточном давлении 15 мм рт. ст. Для гомогенизации использовали метод экструзии при высоком давлении. Экструзию проводили при помощи установки Microfluidiser M-110P производства фирмы Microfluidics, США. Размер липосом и дзета-потенциал определяли методом лазерной дифракции на приборе Malvern Instruments Zetasizer Nano ZS, производства Великобритании. Ультрафильтрацию для получения «химического градиента» проводили на установку Minim2, фирмы PALL, США. Лиофилизацию проводили при помощи лиофильной сушки Quarco, производства КНР. Определение степени инкапсуляции проводили методом ВЭЖХ на приборе Shimadzu LC-20 производства Японии, согласно разработанной ранее методике [13].

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из основных факторов, влияющих на способность липосом удерживать вещество, является жесткость липидной мембраны. Этот показатель увеличивается с возрастанием концентрации холестерина в липидном бислое. Был проведен эксперимент по оценке этого фактора на примере липосом с иринотеканом. Липосомы были получены с использованием технологии «химического градиента» по нижеприведенной методике.

В круглодонные колбы помещали навески липидов с соотношениями яичный фосфатидилхолин / холестерин – 85/15, 80/20, 75/25 и 70/30. Масса навесок во всех случаях была одинакова и соответствовала общей концентрации липидов в полученных липосомах 15 мг/мл. В каждом отдельном случае навеску растворяли в минимальном объеме смеси хлороформ – безводный этиловый спирт, до исчезновения опалесценции. Далее готовили липидную пленку при помощи роторного испарителя. Обработку вакуумом проводили до получения пористой пленки и исчезновения запаха хлороформа. В качестве внутреннего буфера использовали 0,2 М буферный раствор цитрата аммония с pH 2,5. Гомогенизацию в каждом эксперименте проводили на гомогенизаторе высокого давления до достижения размера липосом



80–120 нм. Для получения «химического градиента» использовали ультрафильтрационные кассеты с верхним пределом отсекаания 30 кДа. Загружали липосомы после проведения ультрафильтрации, до общей концентрации иринотекана гидрохлорида 2 мг/мл, с выдержкой 12 ч для завершения процесса инкапсуляции. В качестве криопротектора использовали смесь лактоза/трегалоза с концентрациями по 50 мг/мл. Общая концентрация криопротекторов составляла 100 мг/мл. Перед проведением лиофилизации липосомы замораживали при -40°C в течение 120 мин в камере лиофильной машины. Цикл программы лиофильной сушки составлял 3600 мин, с конечной досушкой при 20°C .

До проведения лиофильной сушки для соотношения яичный фосфатидилхолин / холестерин 85/15; 80/20; 75/25; 70/30 размеры липосом составили 86 нм, 108 нм, 131 нм, 128 нм соответственно, а степень инкапсуляции составила 63%, 79%, 87%, 92% соответственно. После проведения лиофильной сушки размеры липосом составили 112 нм, 126 нм, 141 нм, 135 нм соответственно, а значения инкапсуляции составили 45%, 64%, 76% и 82% соответственно.

На рис. 1 и 2 приведены значения размеров липосом и степени инкапсуляции в зависимости от содержания холестерина до и после лиофилизации.

Из рис. 1. видно, что с ростом содержания холестерина в липидной мембране размер липосом возрастает, что связано с увеличением жесткости и сложностью при гомогенизации мембраны методом экструзии. В случае содержания холестерина 30% было проведено 14 циклов экструзии при 1500 атм, что позволило получить размеры липосом меньше, чем в случае содержания холестерина 25%. При этом можно увидеть, что с ростом содержания холестерина уменьшается разница в размере частиц до и после лиофилизации и регидратации. Так, в ряду возрастания содержания холестерина в липидной мембране 15%, 20%, 25%, 30% происходит уменьшение роста размеров липосом после лиофилизации – регидратации – 26 нм, 18 нм, 10 нм, 7 нм.

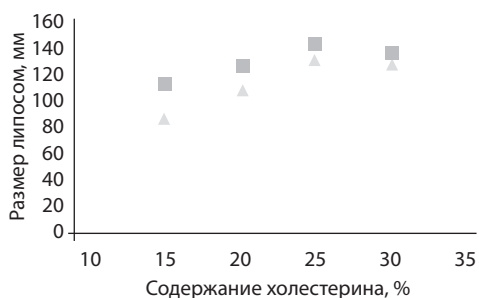


Рис. 1. Размер липосом до и после лиофилизации в зависимости от содержания холестерина в липидном бислое

▲ – размер до лиофилизации

■ – размер после лиофилизации

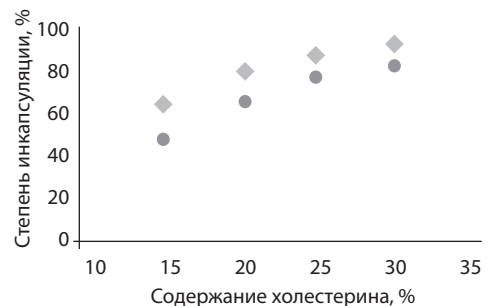


Рис. 2. Инкапсуляция иринотекана в липосомы до и после лиофилизации в зависимости от содержания холестерина в липидном бислое

◆ – степень инкапсуляции до лиофилизации

● – степень инкапсуляции после лиофилизации

Из рис. 2 видно, что с ростом содержания холестерина в липидной мембране происходит уменьшение падения степени инкапсуляции после цикла лиофилизации – регидратации. В ряду возрастания содержания холестерина в липидной мембране 15%, 20%, 25%, 30% происходит уменьшение падения степени инкапсуляции липосом после лиофилизации – регидратации – 18%, 15%, 11%, 10%, что свидетельствует о повышении жесткости липидной мембраны.

Экспериментальные данные подтверждают, что в процессе формирования липосом при содержании холестерина 25% и 30% не удалось избавиться от частиц крупнее 5 мкм. Это делает липосомы с содержанием холестерина неприемлемыми для применения в фармацевтической технологии. Однако они находят применение при изучении кинетики и отработке новых методов инкапсуляции.

Для изучения состава и характеристики стабильности было проведено сравнение трех видов липосом: липосом с иринотеканом, приготовленных по описанной выше методике с использованием воды в качестве среды регидратации; липосом с иринотеканом, приготовленных по описанной выше методике с использованием 0,012% раствора лизина в качестве среды регидратации; липосом с оксалиплатином с липидной мембраной: яичный фосфатидилхолин / холестерин / дипальмитоилфосфатидилглицерин в соотношении 50/20/30. Критериями сравнения были: дзета-потенциал, агрегатная стабильность и появление частиц более 5000 нм в эмульсии после регидратации.

Липосомы с оксалиплатином готовили по следующей методике: липиды яичный фосфатидилхолин / холестерин / дипальмитоилфосфатидилглицерин в соотношении 50/20/30 помещали в круглодонную колбу, растворяли в смеси хлороформ – безводный спирт при кратковременном воздействии ультразвука с частотой 35 кГц. Получали липидную пленку при помощи роторного испарителя. Гидратировали липидную пленку раствором оксалиплатина с концентрацией 4 мг/мл в течение 60 мин при 20 °С. Добавляли раствор криопротектора трегалозы, профильтрованного через полиэфирсульфоновые фильтры с размером пор 0,22 мкм. Корректировали концентрацию оксалиплатина в готовых

Состав и характеристики стабильности испытуемых липосом после регидратации

№ п/п	Состав липидной мембраны и среда регидратации	Дзета-потенциал	Агрегатная стабильность, час	Наличие частиц более 5000 нм
1	Липосомы с иринотеканом. Состав мембраны: яичный фосфатидилхолин / холестерин 80/20. Среда регидратации – вода	-1,2 mV	0,5	Присутствуют после 0,5 ч
2	Липосомы с иринотеканом. Состав мембраны: яичный фосфатидилхолин / холестерин 80/20. Среда регидратации – раствор L-лизина 0,012%	-5,1 mV	Не менее 5 ч	Отсутствуют
3	Липосомы с оксалиплатином. Состав мембраны: фосфатидилхолин / холестерин / дипальмитоилфосфатидилглицерин в соотношении 50/20/30. Среда регидратации – вода	-62,4 mV	Не менее 5 ч	Отсутствуют

липосомах при помощи воды для инъекций. В конечном продукте концентрация оксалиплатина составила 2 мг/мл, общая концентрация липидов – 20 мг/мл. Перед проведением лиофилизации липосомы замораживали при -40°C в течение 120 мин в камере лиофильной машины. Цикл программы лиофильной сушки составлял 3600 мин, с конечной досушкой при 20°C .

В таблице приведены данные по дзета-потенциалу и стабильности трех типов испытанных липосом.

Из таблицы видно, что состав № 1 – липосомы с иринотеканом, состоящие из яичного фосфатидилхолина и холестерина, регидратированные водой и не модифицированные заряженными липидами, имеют ограниченную агрегатную стабильность. При значении дзета-потенциала $-1,2\text{ mV}$ уже через 0,5 ч наблюдения выпадает осадок и фиксируются частицы с размером более 5000 нм.

Для повышения агрегатной устойчивости липосом с иринотеканом, состоящих из фосфатидилхолина – холестерина, при регидратации был использован 0,012%-й раствор L-лизина, что повысило дзета-потенциал полученных липосом до $-5,1\text{ mV}$. При этом значительно повысилась агрегатная стабильность и устойчивость коллоидной системы. Экспериментальные данные свидетельствуют, что при времени наблюдения 5 ч, времени, достаточного для введения препарата путем инфузии, не было отмечено визуального осаждения липосом, и проведение исследования методом лазерной дифракции не показало формирования частиц более 5000 нм.

В случае липосом с оксалиплатином наличие в составе мембраны отрицательно заряженного липида – дипальмитоилфосфатидилглицерина – придает системе отрицательный дзета-потенциал $-62,4\text{ mV}$, что делает ее достаточно устойчивой. За время наблюдения – 5 ч после ресуспендирования не было отмечено визуальной потери агрегатной устойчивости, и при испытаниях методом лазерной дифракции не было выявлено формирования частиц более 5000 нм.

■ ВЫВОДЫ

1. Исследовано влияние холестерина в качестве модификатора жесткости липидной мембраны. Показано, что при увеличении содержания холестерина возрастает стабильность размера липосом после регидратации и стабильность степени инкапсуляции активного вещества. Однако избыточное содержание холестерина ведет к появлению частиц крупнее 5000 нм, что требует проведения дополнительных исследований по оптимизации состава липидной мембраны.
2. Показано, что при составе липидной мембраны фосфатидилхолин/холестерин система является нестабильной после регидратации. С применением воды в качестве среды ресуспендирования уже через 30 мин после регидратации наблюдается потеря агрегатной устойчивости.
3. Для повышения агрегатной устойчивости липосом с составом мембраны фосфатидилхолин/холестерин предложено применение 0,012%-го раствора L-лизина, увеличивающего дзета-потенциал до $-5,1\text{ mV}$. Этого достаточно для стабильности липосомальной системы в период не менее 5 ч, т.е. времени, достаточного для проведения инфузии.

4. Использование заряженных липидов – дипальмитоилфосфатидил-глицерола на примере липосом с оксалиплатином придает необходимую седиментационную устойчивость липосомальной системе при использовании воды в качестве среды ресуспендирования и обеспечивает дзета-потенциал -62,4 mV, что достаточно для стабильности липосом после регидратации в течение 5 ч.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Khan A.Y., Talegaonkar S., Iqbal Z. (2006) Multiple emulsions: An overview. *Current drug delivery*, vol. 3, no 4, pp. 429–443.
2. Chueshov V. (ed.) (2002) *Promishlennaya tehnologiya lekarstv* [Industrial technology of medicines production]. Tom 2. Kharkiv. NFAU, 716 p.
3. Chaize B., Colletier J.P., Winterhalter M. (2004) Encapsulation of enzymes in liposomes: High encapsulation efficiency and control of substrate permeability. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*, vol. 32, pp. 67–75.
4. Kulkarni P.R., Yadav J.D., Vaidya K.A. (2011) Liposomes: a novel drug delivery system. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, vol. 3, pp. 10–18.
5. Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S. (2013) Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.*, vol. 8, pp. 102–109.
6. Wagner A., Vorauer K. (2011) Liposome technology for industrial purposes. *Journal of Drug Delivery*, vol. 1, pp. 1–9.
7. Bozzuto G., Molinari A. (2015) Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 975–999.
8. *European Pharmacopoeia (Ph. Eur.)* 9th Edition.
9. Stadnichenko A., Krasnopolsky Y., Shvets V., Yarnikh T. (2016) Issledovanie stabilnosti irinotekana pri ispolzovanii razlichnikh metodov zagruzki liposom [Research on the stability of irinotecan using various methods of loading liposomes]. *Science Rise: Pharmaceutical Science*, vol. 2, pp. 30–36.
10. Brown M.S., Goldstein J.L. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.*, vol. 89, pp. 331–340.
11. Guida V. (2010) Thermodynamics and kinetics of vesicles formation processes. *Adv Colloid Interface Sci.*, vol. 161, pp. 77–88.
12. Bartolomeo M.D., Ciarlo A., Ciarlo A. (2015) Capecitabine, oxaliplatin and irinotecan in combination, with bevacizumab (COI-B regimen) as first-line treatment of patients with advanced colorectal cancer. An Italian Trials of Medical Oncology phase II study. *European Journal of Cancer*, vol. 51, pp. 473–481.
13. Stadnichenko A., Krasnopolsky Y., Shvets V. (2015) Razrabotka i validaciya metodiki opredeleniya stepeni inkapsuliacii irinotekana gidrochlorida v liposomy [Development and validation of the procedure for determining the degree of encapsulation of irinotecan hydrochloride in liposomes]. *Biofarmaceutichesky zhurnal*, vol. 7, no 1, pp. 53–55.

Поступила/Received: 09.03.2017

Контакты/Contacts: alstn@mail.ru, biotech_ntu_khpi@ukr.net, tl.@nuph.edu.ua